79-84

35741(15)

动 物 学 研 究 1994, 15 (4): 79—84 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

五氯酚对大型溞的急性亚慢性和慢性毒性

周永欣 成水平 孙美娟 胡 炜
(中国科学院水生生物研究所 武汉 430072)

Q959.305

A

摘要 本文采用换水式试验研究了五氯酚(PCP)对大型溞(*Daphnia magna*)的急性、亚慢性和慢性毒性，稀释水硬度为80—100 mg/L(以 $CaCO_3$ 计)。急性和慢性试验均使用小于一日龄的幼溞，试验温度为25—26℃，慢性试验进行了20 d。用小于一日龄幼溞进行的亚慢性试验暴露了19 d，而用四日龄幼溞的亚慢性试验则进行了16 d，水温均保持在19—20℃。PCP对大型溞的24 h和48 h EC_{50} 分别是489和245 μg/L。依据第1胎所产幼溞数求得的最低可观察效应浓度(LOEC)和无可观察效应浓度(NOEC)，在慢性试验中分别是160和80 μg/L，在19 d亚慢性试验中分别为200和100 μg/L，二者相近。试验结果表明，第1胎所产幼溞数是敏感的指标。

水蚤

关键词 大型溞，五氯酚，急性毒性，亚慢性毒性，慢性毒性 毒性

溞类具有生活周期短、繁殖快、实验室易培养、对一些污染物质敏感等优点，以及它们在水域生态系统中的重要性，已广泛地用作水生毒理学试验材料。由于新合成的有毒化学品数量的增加，溞类慢性试验显然已无法及时地为化学品的危险性评价提供毒理学资料。在如何缩短大型溞慢性毒性试验周期方面，有从小于一日龄幼溞开始暴露至产3胎幼溞的亚慢性试验(OECD, 1982; Adams等, 1985; Elnabarawy等, 1986)，也有用四日龄溞至产3胎幼溞的试验(Winner, 1988)。此外，尚有棘爪网纹溞(*Ceriodaphnia reticulata*)的7天生活周期试验(Mount等, 1984)和另一种网纹溞(*Ceriodaphnia dubia*)幼溞至产3胎幼溞的毒性试验(ASTM, 1990)，以及4天存活及繁殖试验(Oris等, 1991)。本文观察了参比毒物——五氯酚对大型溞的急性、亚慢性和慢性毒性，试图在这方面作进一步探讨。

1 材料和方法

试验用大型溞(*Daphnia magna*)由本实验室提供，急性毒性试验使用小于一日龄的幼溞，试验容器为125 ml烧杯，盛100 ml试验溶液，每个容器放10个幼溞，每天更换一次试验溶液。

慢性试验的试验容器用500 ml烧杯，盛400 ml试验溶液，放10个小于一日龄的幼溞。对照组及各浓度组均设置3个平行。每天更换一次试验溶液，而后投喂人工培养的斜生栅藻(*Scendesmus obliqnus*)。每天除观察记录死亡数外，开始繁殖后及时将所产幼溞移

本文1993年8月13日收到，1994年3月30日修回

出，并记录各容器的幼溞数。急性和慢性毒性试验水温为25—26℃，光暗比是16∶8。

亚慢性毒性试验，使用同一批小于一日龄的幼溞，随机移放到每一个试验容器，分两种方式进行试验。一是从移入试验容器后即开始暴露；二是幼溞移入容器后第3天开始试验，两种方式的试验均持续到产完3胎幼溞结束。试验容器均用50 ml烧杯，盛40 ml试验溶液，每个容器放1个溞，对照组及各浓度组均设5个平行，试验温度保持在19—20℃，其它条件均与慢性试验相同。

五氯酚钠(化学纯)系上海试剂一厂产品，含量不少于98.0%。贮备液用蒸馏水配制，浓度为1.28 mg PCP／ml。试验稀释用水采用配制水，硬度为80—100 mg／L(以$CaCO_3$计)，pH7.4—7.8(USEPA，1985)。

半数有效浓度(EC_{50})采用图解法(Litchfield等，1949)计算，慢性和亚慢性试验数据处理使用方差分析和多重比较(Dunnett，1955)。

2 结果

2.1 急性毒性

经五氯酚暴露的大型溞的累计死亡率列于表1，由此而计算所得的24和48 h EC_{50}分别是489和245 μg／L，95%置信限分别为233—1024和191—314 μg／L。

表1 经五氯酚暴露的大型溞的累计死亡率(%)

Tab. 1 Cumulative mortality of *Daphnia magna* exposed to PCP

项目	PCP(μg／L)							
	对照	10	20	40	80	160	320	640
24 h 死亡率	0	10	10	10	10	30	40	60
48 h 死亡率	10	10	10	10	10	30	60	100

2.2 慢性毒性

整个试验持续20天，共产幼溞8胎。各试验组的累计死亡率，每组每个成溞每胎平均产幼溞数及个体8胎平均总产幼溞数见表2。20 d累计平均死亡率，最高浓度组(160 μg／L)是5.8%，而5和20 μg／L浓度组未出现死亡，10、40和80 μg／L组的死亡率分别是7.3%、3.3%和6.8%，对照组的死亡率最高(13.3%)。因此，在试验设置的浓度范围内，未显示出PCP对大型溞的存活有任何影响。

试验第6天开始产第1胎幼溞，此后大致每隔1天产1胎。试验期间每个成溞8胎的累计平均产幼溞数，160 μg／L组是91.6个，对照组94.2个，10 μg／L组最小（90.6个），产溞最多的是40 μg／L组(103.1个)，但数据经统计处理，各浓度组与对照组均无显著性差异($P>0.05$)。第1胎的平均产溞数，对照组是9.9个，160 μg／L组6.4个，其它各浓度组的平均产溞数略高于对照组，统计处理表明，最高浓度组的平均产溞数明显地低于对照组($P<0.05$)，除第7胎的平均产溞数也同样存在显著性差异($P<0.05$)外，其它各胎各组之间均无显著性差异($P>0.05$)。因此，由第1胎的平均产溞数为指标求得五氯酚对大型溞的LOEC是160 μg／L，而NOEC则为80 μg／L。

2.3 亚慢性毒性

小于一日龄幼溞持续暴露19 d，而用四日龄溞为材料的试验历时16 d。

在从小于一日龄幼溞开始暴露，至产完3胎结束的试验中，对照组、25、50和100 μg／L组均未出现死亡，从200 μg／L开始出现死亡，而且死亡率随着浓度的上升而增加(表3)。统计处理表明，200 μg／L组的死亡率与对照组无显著性差异($P>0.05$)，400

和 600 μg／L 组与对照组存在着显著性差异($P<0.05$)，因此由死亡指标求得的 LOEC 是 400 μg／L，而 NOEC 为 200 μg／L。每个成溞累计平均产溞数，对照组与 100 μg／L 及

表 2　五氯酚对大型溞存活和繁殖的影响

Tab. 2　Effects of PCP on survival and reproduction of *D. magna*

项目	胎数	PCP(μg／L)						
		对照	5	10	20	40	80	160
每个成溞平均产溞数	1	9.9±0.6	10.2±0.6	10.3±0.9	11.2±0.6	10.9±0.9	10.4±3.0	6.4±0.7
	2	14.7±1.6	12.5±1.1	11.5±2.2	14.0±2.7	10.7±1.9	10.3±2.0	11.4±2.5
	3	0.5±0.4	2.0±0.3	1.1±1.5	2.4±2.1	2.0±3.1	1.0±1.4	1.9±0.3
	4	18.4±0.5	16.3±1.5	15.3±2.4	16.1±1.3	18.3±3.3	18.3±1.5	16.7±1.5
	5	14.1±3.6	13.3±4.2	14.3±1.3	17.1±1.9	17.0±1.1	17.5±6.6	16.5±2.3
	6	11.7±7.2	14.2±5.2	17.7±6.9	18.5±3.7	12.5±1.2	24.4±4.1	19.8±5.4
	7	19.7±7.6	16.4±2.9	13.3±6.1	12.8±6.3	19.0±3.1	8.9±4.0	8.7±0.6
	8	5.3±2.1	6.2±1.8	7.1±2.4	10.4±4.1	12.7±3.3	11.2±2.3	10.2±1.1
累计		94.2±6.9	91.1±2.8	90.6±6.9	102.6±9.1	103.1±4.0	102.0±19.0	91.6±7.3
累计死亡率(%)		13.3±11.6	0	7.3±6.4	0	3.3±5.8	6.8±5.8	5.8±9.8

以下各浓度组差异不大，200 μg／L 组(34.2 个)虽然低于对照组(39.9 个)，但无显著性差异($P>0.05$)。第 1 胎的平均产幼溞数从对照组至 200 μg／L 组依次分别是 12.6、11.5、12.0、9.2 和 8.7 个(表 3)，除 200 μg／L 组与对照组存在显著性差异($P<0.05$)外，其它各浓度组与对照组均无显著性差异($P>0.05$)。表 3 各浓度组第 2 和第 3 胎的平均产溞数与对照组均无显著性差异($P>0.05$)。因此由第 1 胎平均产溞数求得 PCP 对大型溞的 LOEC 和 NOEC 分别是 200 和 100 μg／L。

表 3　大型溞经 PCP 暴露 19 d 的平均产幼溞数和累计死亡率

Tab. 3　Mean young per aduct and cumulative mortality for *Daphnia magna* exposed to PCP for 19 days

项目	胎数	PCP(μg／L)						
		对照	25	50	100	200	400	600
每个成溞平均产溞数	1	12.6±2.5	11.5±2.1	12.0±2.7	9.2±2.2	8.7±1.3		
	2	12.6±2.3	15.8±4.9	12.0±3.7	12.8±2.2	11.5±2.1		
	3	14.6±3.1	14.3±3.3	14.5±2.1	16.6±4.2	14.0±1.2		
累计		39.9±6.3	41.6±9.2	38.5±5.6	38.6±6.8	34.2±3.4		
累计死亡率(%)		0	0	0	0	20±44	80±44	100

从四日龄的大型溞开始暴露至产完 3 胎幼溞结束试验的数据列于表 4。400 μg／L 组的平均产溞数除第 1 胎(11.5 个)外，第 2、3 胎和累计平均数都比对照组少，200 μg／L 组的情况也相似。100 μg／L 组第 3 胎(17.3 个)与对照组(17.6 个)相近，其它均少于对照组。第 1 胎平均产幼溞最多的是 200 μg／L 组(14.8 个)，第 2 胎对照组最多(16.2 个)，第 3 胎 50 μg／L 组最高(18.7 个)，累计平均数最大的也是 50 μg／L 组(45.2 个)。但是，这些数据不论是按每胎还是累计平均值进行统计处理，各浓度组与对照组均无显著性差异($P>0.05$)，因此无法依据繁殖指标求得 LOEC 和 NOEC。累计死亡率，400 μg／L 组是 20%，600 μg／L 组则全部死亡，其它各组均未出现死亡，而 400 μg／L 组又与对照组无

显著性差异($P>0.05$)，因此由死亡指标求得的 LOEC 是 600 μg / L，NOEC 为 400 μg / L。

表4 经 PCP 暴露 16 天的大型溞的平均产幼溞数和累计死亡率

Tab. 4 Mean young per aduct and cumulative mortality for *Daphnia magna* exposed to PCP for 16 days

	胎数	浓度(μg / L)						
		对照	25	50	100	200	400	600
每个成溞平均产溞数	1	11.0±0 7	13 2±3.4	11.0±2.3	9 0±2.8	14 8±4.7	11.5±0.6	
	2	16.2±2 5	13.8±4.0	15.5±1.3	9.5±3.1	11 8±5.1	12.5±2.6	
	3	17.6±2.4	17.5±2.4	18.7±2.2	17 3±1.5	14.0±6.3	15.5±4.4	
累计		44.8±4.1	44.5±6.4	45.2±4.4	35.8±5.7	40.6±11.6	39.5±4 6	
累计死亡率(%)		0	0	0	0	0	20±44	100

3 讨论

3.1 五氯酚对大型溞的急性毒性，PCP 含量为 96%时，48 h EC_{50} 是 240 μg / L；95%置信限 138—307 μg / L；而含量为 86%时，48 h EC_{50} 则是 410 μg / L，95%置信限 319—527 μg / L(Mayer 等，1986)。Kühe 等(1989)的报道，24 和 48 h EC_{50} 分别是 670 和 550 μg / L，95%置信限分别为 540—830 μg / L 和 450—670 μg / L。本试验在 25—26℃条件下求得的 PCP 对大型溞的 24 和 48 h EC_{50} 是 489 和 245 μg / L。95%置信限分别为 233—1024 和 450—314 μg / L，与文献报道相接近。

3.2 Adema(1978)观察了 PCP 对大型溞的慢性毒性，以死亡指标计算的无效应浓度是 180 μg / L，而用繁殖指标得出的无效应浓度则为 300 μg / L，从而认为死亡比繁殖更为敏感。Winner(1988)用 PCP 对大型溞进行亚慢性毒性试验时，用存活和繁殖指标得出的无效应浓度都是 300 μg / L。我们以每个成溞第 1 胎平均产幼溞数计算 LOEC 和 NOEC，在 20 d 慢性试验中其值分别是 160 和 80 μg / L，而在小于一日龄幼溞至产完 3 胎幼溞的亚慢性试验中则分别为 200 和 100 μg / L，两次试验的结果相当接近。用累计死亡率为指标时，在慢性试验中 LOEC > 160 μg / L，亚慢性试验求得的 LOEC 和 NOEC 则分别是 400 和 200 μg / L。在我们的试验中，显然繁殖指标比死亡指标更为敏感。

3.3 大型溞的亚慢性试验目前大致可分为两种方式：一是以小于一日龄幼溞为材料，暴露至产 3 胎幼溞终止试验(Adams 等，1985；Elnabarawy 等，1986)；二是从四日龄溞开始暴露至产 3 胎幼溞(Winner，1988)，这些试验都以累计死亡率和累计平均产溞数等为指标。在我们用四日龄溞为材料的亚慢性试验中，不论是每胎产溞数还是累计产溞数，各浓度组与对照组均无显著差异，而根据死亡指标，求得的 LOEC 和 NOEC 是 600 和 400 μg / L。而用小于一日龄幼溞开始暴露的试验中，第 1 胎平均产溞数最为敏感，由此而求得的 LOEC 和 NOEC 分别为 200 和 100 μg / L。如果第 1 胎的平均产溞数对其它化学物质也同样是最敏感的指标，那么大型溞的亚慢性毒性试验周期尚可进一步缩短。

参 考 文 献

Adema D M M，1978. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic tests. *Hydrobiologia*，59：125-134.

Adams W J, Heidolph B B, 1985. Short-cut chroaic toxicity estimates using *Daphnia magna*. In: Cardwell R D *et al* eds. Aquatic toxicology and hazard assessment: Seventh Symposium. Philadelphia, PH: American Society for Testing and Materials, 87-102

ASTM, 1990. Standerd guide for conducting three-brood renewal toxicity teste with *Ceriodaphnia dubia*. E 1295-89. In: Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PH: American Society for Testing and Materials, 11 04, 905-923.

Dunnett C W, 1955. A multiple comparison procedure for comparing several treatment with a control. *J. Am. Stat. Assoc.*, **50**: 1096-1121.

Elnabarawy M T *et al*, 1986. Relative sensitivity of three *Daphnia* species to selected organic and inorganic chemicals. *Environ Toxicol Chem.*, **5**: 393-398

Kühe R *et al*. 1989. Results of the harmful effects of selected water pollutants (anilins, phenols, aliphatic compounds) to *Daphnia magna*. *Water Res.*, **23**: 495-499

Litchfield J T, Wilcoxon F A, 1949. A Simplified method of dose / effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **96**: 99-113

Mater P L Jr, Ellersick M R, 1986. Mannual of acute toxicity: Interpretation and date base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. Washington, D C: U. S. Dep. Inter. Fish and Wildlife Service / Resource Publication, 160: 1-29

Mount D I, Norberg T J, 1984. A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test *Environ Toxicol. Chem*, **3**: 425-434.

OECD, 1981. Guidelines for testing of chemicals. Paris France OECD, 202: 1-15.

Oris J T *et al*. 1991. A four-day survival and reproduction toxicity test for *Ceriodaphnis dubia*, *Environ. Toxicol. Chem.*, **10**: 217-224

USEPA, 1985. Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms, . Cincinnati, OH: USEPA. Environmental Monitoring and Support Laboratory

Winner R W, 1988. Evaluation of the relative sensitivities of 7-D *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* toxicity tests for cadmium and sodium pentachlorophenate. *Environ. Toxicol. Chem.*, **7**: 153-159.

ACUTE, SUBCHRONIC AND CHRONIC TOXICITY OF PENTACHLOROPHENOL TO *Daphnia magna*

Zhou Yongxin　Cheng Shuiping　Sun Meijuan　Hu Wei

(*Institute of Hydrobilogy, Academia Sinica, Wuhan* 430072)

Abstract

The acute, subchronic and chronic toxicity of pentachlorophenol (PCP) to *Daphnia magna* were investigated under renewal condition with a hardness of 80-100 mg / L (as $CaCO_3$). At 25-26℃, the first instar (less than 24 h old) *D. magna* was used in the acute

and chronic toxicity tests. The duration of the chronic test was 20 d. At 19–20℃, the subchronic exposure was lasted 19 d for less than 24 h old *D. magna* while it was lasted 16 d for 4 d old *D. magna*. The 24 and 48 h EC_{50} for *D. magna* were 489 and 245 μg/L, respectively. Depended on the population of the first brood, the LOEC and NOEC were 160 and 80 μg/L in the chronic test, respectively, which were similar to those in 19 d subchronic test (200 and 100 μg/L). The results indicated that the population of the first brood was a sensitive endpoint.

Key words *Daphnia magna*, PCP, Acute toxicity, Subchronic toxicity, Chronic toxicity

(上接第72页)

从表中可知材料经甲醇预先固定后其得率与不固定者很接近，只略低一点。经固定后，操作温度对得率无影响。

5种条件下的组蛋白提取物其电泳图谱如图1所示。

5种条件下都得到了5种组蛋白组分的6条分离电泳带(其中H_1有两条亚带)。但材料是否经甲醇预先固定其电泳图谱有所不同。不经固定者(图1中的A、B、C)除组蛋白的条带外，还有许多浅的杂蛋白条带；而经固定者(图1中的D、E)未见有杂蛋白条带。扫描图谱(图2)也显示出相同结果。

这些事实表明由于提取过程大为简化缩短，即便未使用蛋白酶抑制剂，也能获得完整的5种组蛋白而无水解迹象；若材料经甲醇预先固定，不仅无需使用蛋白酶抑制剂，而且在室温下操作也未见有降解迹象，并且所获组蛋白的纯度也大为提高。原因是甲醇的固定一方面使细胞内蛋白酶完全失活，另一方面细胞内原是酸可溶性的一些中性乃至弱碱性的蛋白得以固定，不再易随碱性较强的组蛋白一同被抽提出来。

值得注意的是经甲醇固定后组蛋白的得率稍有下降，但若从纯度提高来考虑，这种下降并不显著。且若将固定后的细胞磨碎后进行抽提，得率还会有所提高，而对纯度无多大影响。

以往的酸抽提法自60年代末以来无多大改进一直沿用至今。本方法另辟途径，采用甲醇预先固定、再酸抽提、二次酸溶解去杂蛋白的提取方法，不仅简化了操作、克服了以往方法的缺点，且适用性更广，效果更佳。

文建凡 李靖炎

Wen Jianfan Li Jingyan

(中国科学院昆明动物研究所细胞及分子进化实验室 昆明 650223)

(*Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica* 650223)